

RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA AGRESIVIDAD DE AISLAMIENTOS DE *Ophiostoma ulmi* Y *O. novo-ulmi* Y SU PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y CERATOULMINA EN MEDIO LÍQUIDO.

DIEZ J.J.*; GARCÍA-NIETO, M. E.**; MENÉNDEZ, Y.** & GÍL, L. A**.

*DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL Y SILVOPASCICULTURA. ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS. AV/ MADRID 57. 34004. PALENCIA.

** DEPARTAMENTO DE SILVOPASCICULTURA. ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MONTES. CIUDAD UNIVERSITARIA. 28.040. MADRID.

RESUMEN

La producción de biomasa y de la toxina ceratoulmina (C.U.) en el medio líquido de SCALA *et al.* en agitación se determinó en 9 aislamientos de grafiosis, estudiándose la relación existente con la agresividad, cuantificada previamente por su crecimiento en medio sólido Agar-Malta. El poder patogénico de los aislamientos fúngicos no se mostró relacionado con su crecimiento en medio líquido, de forma diferente a los que ocurre en medio sólido. Por el contrario, sí se encontró una relación entre la producción de C.U. y la agresividad en los genotipos analizados, lo que refuerza el papel de esta toxina en el desarrollo de la grafiosis.

P.C.: *Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*, grafiosis, ceratoulmina.

SUMMARY

Biomase and ceratoulmin (C.U.) production in the agitated SCALA *et al.* liquid media was determined in 9 Dutch Elm Disease (D.E.D.) isolates, studying the relationship with aggressiveness, previously quantified by their growth in Agar-Malt solid media. Pathogenic power of fungal isolates was not associated with liquid media growth, different to C.U. production that was highly related with fungal genotypes aggressiveness. These result reinforce the role of this toxin in D.E.D. development.

K.W.: *Ophiostoma ulmi*, *Ophiostoma novo-ulmi*, Dutch Elm Disease, ceratoulmin.

INTRODUCCIÓN

La medida del crecimiento de las colonias en medio Agar-Malta, a 22°C, ha sido el método normalmente empleado para diferenciar a los aislamientos de la grafiosis no agresiva (*Ophiostoma ulmi*) de la agresiva (*O. novo-ulmi*) (BRASIER *et al.*, 1981). Los aislamientos de la especie no agresiva poseen un crecimiento inferior a los 3,1 mm/día en estas condiciones, frente a los de la especie agresiva cuyo crecimiento es superior. La morfología de la colonia también ha servido para diferenciar ambas especies, siendo lisa, cética y cespitosa en *O. ulmi* y fibrosa, estriada y petaloide en *O. novo-ulmi*.

La producción de una sustancia de naturaleza tóxica denominada ceratoulmina (C.U.) también parece distinguir a ambas especies. *O. novo-ulmi* sintetiza gran cantidad de esta sustancia mientras que *O. ulmi* produce poca o nula (TAKAY, 1980; TEGLI *et al.*, 1993). Sin embargo en ocasiones se han observado grandes variaciones en este parámetro, encontrándose

aislamientos de la especie agresiva con producciones muy bajas (SCHEFFER *et al.*, 1987), inferiores incluso a algunas presentes en la especie no agresiva. RICHARDS (1994) relaciona directamente a la C.U. con la aparición de los síntomas de la grafiosis, señalando su significado instrumental para la realización de ensayos de selección de olmos resistentes en ausencia del patógeno.

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar la relación existente entre el crecimiento de varios aislamientos de grafiosis en medio sólido con su producción de C.U. en medio líquido. Con ello pretendemos comprobar la utilidad de esta variable para la selección de genotipos fúngicos de alto poder patogénico, imprescindibles para el éxito de cualquier programa de mejora genética de los olmos frente a la grafiosis. Al mismo tiempo, se ha querido comprobar si el crecimiento de los aislamientos en medio líquido sigue la misma relación existente que en el medio sólido.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Los genotipos de los hongos utilizados en el estudio se aislaron a partir de trozos de maderas procedentes de árboles infectados situados en distintos puntos de la geografía española. Para ello se tomaron brotes jóvenes afectados de grafiosis (con anillos oscuros en el xilema) de un diámetro aproximado de 10 mm que se cortaron en cilindros de unos 5 mm de altura. Las colonias del hongo aparecieron tras incubar este material a 22° C en medio selectivo Agar-Malta (Oxoid) al 2% con sulfato de estreptomycin durante 10 días.

Para calcular el crecimiento de los aislamientos se tomó, con ayuda de un bisturí, un trozo de agar de 3 mm de lado del borde de la colonia formada alrededor de los cilindros de madera, y se colocó en una placa Petri de 9 mm conteniendo 25 ml del medio Agar-Malta. La tasa de crecimiento (en mm/día) se calculó como el crecimiento medio diario de la colonia, tras siete días de cultivo, sobre dos ejes perpendiculares secantes en el centro del trozo de agar. Los aislamientos con un crecimiento inferior a 3,1 mm/día fueron clasificados como *O. ulmi*, mientras que los que presentaban un crecimiento superior se clasificaron como de la especie *O. novo-ulmi*. El aspecto de la colonia sirvió para confirmar las asignaciones por crecimiento.

El medio de SCALA *et al.* (1993) fue el utilizado para la producción de cultivos líquidos de *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*. Los cultivos iniciales se consiguieron al inocular en frascos Erlemmeyer de 100 ml, que contenían 25 ml del medio de cultivo estéril, un trozo de medio agarizado de 3 mm de diámetro, obtenido a partir del borde de una colonia del hongo. Los matraces se incubaron a 23 °C en la oscuridad durante una semana a 125 r.p.m. A partir de estos cultivos iniciales se inocularon otros matraces (100 ml y 25 ml de medio), con una concentración de 10⁵ esporas/ml. Estos cultivos fueron incubados en las mismas condiciones que los iniciales durante 10 días, con la intención de conseguir una producción óptima de C.U. (TEGLI *et al.* 1993). Al final de este periodo se determinaron en los cultivos líquidos distintos parámetros relacionados con la producción de biomasa (el peso fresco, el peso seco, el contenido en agua y el número de esporas/ml) y con la producción de ceratoulmina (el índice de producción de ceratoulmina, las proteínas totales del filtrado y las proteínas totales del micelio).

Para la determinación del peso fresco, los cultivos en medio líquido se centrifugaron a 7500 r.p.m. (8000 g) durante 20 minutos, decantándose a continuación el sobrenadante (medio de cultivo del hongo). El precipitado (levaduras y micelio) se filtró al vacío durante 2 minutos con ayuda de un matraz Buchner para eliminar restos de agua, pesándose a continuación en una balanza. Este peso fue tomado como peso fresco de los distintos aislamientos.

El peso seco se determinó a partir de este material después de ser mantenido en una estufa de circulación de aire a 75 °C durante 24 horas. El contenido en humedad se determinó a partir de ambas variables. Para determinar el número de esporas en los cultivos líquidos de *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi* al término del cultivo (10 días), se utilizó una cámara Thoma.

El sobrenadante obtenido al centrifugar el cultivo líquido del hongo se pasó a través de filtros Millipore Sterivex de 0.22 µm. de tamaño de poro, determinándose la turbidez de las muestras a 400nm con ayuda de un espectrofotómetro. El índice de producción de ceratoulmina (IPC) se obtuvo multiplicando el valor de la densidad óptica, obtenido de la forma anteriormente citada, por 100 y por el factor de dilución (F.D.):

$$\text{I.P.C.} = 100 \times \text{F.D.} \times \text{D.O.}_{400\text{nm}}$$

A partir del precipitado obtenido tras la centrifugación se realizó la determinación de las proteínas estructurales del hongo, mientras que a partir del sobrenadante una vez filtrado (Millipore de 0.22 µm), se determinaron las proteínas en solución. En ambos casos se utilizó el método de BRADFORD (1976), empleándose seroalbúmina bobina (BSA) para la realización de la recta patrón.

El proceso de manipulación realizado sobre los aislamientos se llevó a cabo dentro de una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones, utilizando siempre material previamente esterilizado en una estufa a 120° C durante 3 horas, o esterilizado momentos antes de su uso en etanol al 70% y un mechero tipo Bunsen.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados representan la media de los valores obtenidos.

RESULTADOS.

Todos los aislamientos de las especies *O. ulmi* y *O. novo-ulmi* crecieron bien en los dos medios de cultivo utilizados: el medio sólido Agar-Malta y el medio líquido de SCALA *et al.* modificado.

La determinación del crecimiento en medio Agar-Malta a 22°C permitió clasificar los aislamientos, resultando 5 de ellos pertenecientes a la especie agresiva frente a 4 de la no agresiva (Tabla 2), todos de las islas Baleares. El crecimiento de los aislamientos de *O. ulmi* osciló entre los 1,6 mm/día de PM-FD1 y los 2,9 mm/día de PM-PL1. Todos los genotipos de la especie agresiva experimentaron un crecimiento superior a los 4 mm/día destacando TO-VL1 con 6,3 mm/día.

El peso fresco de los cultivos líquidos osciló entre los 490 mg/cultivo de SO-AL1 y los 810 mg/cultivo de PM-AB1. El peso seco fue aproximadamente cinco veces menor, ya que el contenido en agua de este material se situó en torno al 80%. No se encontraron diferencias en estas tres variables (PF, PS y CRA, Tabla 2), entre *O. novo-ulmi* y *O. ulmi*, pese a realizar el ensayo a 23°C, temperatura más cercana a la óptima de crecimiento para *O. novo-ulmi* en el medio sólido Agar-Malta (20-22°C). El coeficiente de correlación encontrado al comparar el crecimiento en medio sólido con el experimentado en medio líquido fue prácticamente nulo (-0.01, -0.03 y -0.00 para PF, PS y CRA respectivamente).

Los genotipos de la especie *O. novo-ulmi* produjeron gran cantidad de ceratoulmina (Tabla 2), a diferencia de los aislamientos de *O. ulmi* (566 frente a 129 IPC). El coeficiente de correlación encontrado al comparar el crecimiento en medio sólido con el IPC fue alto (0,83), lo que confirma la relación existente entre C.U. y agresividad (Figura 1a). Las mayores variaciones en el IPC se han observado en la especie no agresiva, donde frente a genotipos con una prácticamente nula producción de C.U., encontramos otros con un IPC apreciable (PM-MT1=382), tan sólo un 20% inferior al mínimo hallado en la especie agresiva. La

producción de C.U. por parte de los aislamientos de la especie *O. novo-ulmi* mostró menos variación.

Las proteínas excretadas por *O. novo-ulmi* al medio fueron casi cuatro veces las de *O. ulmi* (Tabla 2). El coeficiente de correlación encontrado entre esta variable y el crecimiento en medio sólido fue algo mayor (0,88) al obtenido para el IPC. Las mayores diferencias entre genotipos se siguen dando en la especie no agresiva, donde existen aislamientos que triplican el contenido de proteínas en sus filtrados frente a otros (PM-MT1, 79 µg/ml frente a PM-DF1, 26 µg/ml).

La relación existente entre la cantidad de proteínas en los filtrados de cultivos medida por el método de Bradford y la cantidad de ceratoulmina determinada por turbidometría viene reflejada en la Figura 1b. El coeficiente de correlación encontrado posee un valor alto (0.97), lo que indica que los cambios en las proteínas responden al incremento de la ceratoulmina, y ésta debe representar la mayor parte de las segregadas por el hongo al medio.

De forma diferente a como ocurría con las proteínas excretadas, los valores medios de las proteínas estructurales de *O. ulmi* representan casi el doble de los registrados en *O. novo-ulmi* (Tabla 6). Existe una relación inversa (coeficiente de correlación, -0,83) entre la cantidad de proteína en el hongo y su crecimiento en medio sólido.

DISCUSIÓN

La agresividad de los aislamientos de grafiosis no se mostró relacionada con su tasa de crecimiento en medio líquido. Este diferente comportamiento del hongo en ambos medios (el líquido de SCALA *et al.* y el sólido Agar-Malta) puede deberse a su distinta composición. SMALEY *et al.* (1993) trabajando con otro medio sólido de cultivo fúngico distinto (PDA) también obtuvieron resultados diferentes a los observados en Agar-Malta. El material de experimentación utilizado en los ensayos también pudo haber influido en el resultado final del experimento. En medio sólido el hongo desarrolla micelio, mientras que en medio líquido la forma mayoritaria es la de levadura. Estas distintas fases podrían determinar las diferencias en el crecimiento descritas entre *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*.

Los aislamientos de *Ophiostoma novo-ulmi* produjeron gran cantidad de ceratoulmina, como ya describieron otros autores (TAKAY y RICHARDS, 1978; TAKAY, 1980; TEGLI *et al.*, 1993), a diferencia de los aislamientos de *Ophiostoma ulmi* que sintetizaron poca o nada. La agresividad de los aislamientos fúngicos, medida por su tasa de crecimiento en medio sólido Agar-Malta a 22°C, se ha mostrado relacionada en un 83% de forma logarítmica con al producción de C.U.. Parece clara, por lo tanto, la relación entre la síntesis de este compuesto y la agresividad de los aislamientos fúngicos. Sin embargo, esta relación no es total (el estadístico $R^2=70,4$ nos indica que existe un 29,6 % de la variación que no puede explicarse con este modelo predictivo), presentando además cierta variabilidad con el tiempo y las condiciones de cultivo (DORION *et al.*, 1994), por lo que no sería aconsejable utilizarla como factor decisorio para la selección de aislamientos con altos niveles de virulencia. La medida del crecimiento en medio sólido parece seguir siendo más fiable.

La producción de ceratoulmina en los aislamientos de la especie agresiva presentó gran homogeneidad, en concordancia con los resultados de TEGLI *et al.* (1993). Este resultado indica que este carácter posiblemente haya sido seleccionado durante el proceso evolutivo al estar relacionado con la virulencia.

Por el contrario, la variabilidad encontrada en la producción de ceratoulmina entre los aislamientos de *O. ulmi* utilizados en el ensayo (procedentes de la isla de Mallorca, donde aún no ha aparecido la grafiosis agresiva), podría indicar un comienzo en la selección frente a este

carácter por parte de esta especie. Al fin y al cabo la aparición de *Ophiostoma novo-ulmi* se propone como surgida a partir de *O. ulmi*, por un proceso de especiación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

BRASIER, C. M.; LEA, J.; RAWLING, M. (1981). The aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* have a different temperature optima for growth. *Trans Britist Mycol. Soc.* 76 (6):213-218.

DORION, N; BIGOT, C; NEUMANN, P. (1994). Evaluation of Dutch Elm Disease susceptibility and pathogenicity of *Ophiostoma ulmi* using micropropagated elm shoots. *Eur. J. For. Path.* 24:112-122.

RICHARDS, W. C. (1994). *Cerato-ulmin: a wilt toxin of Dutch Elm Disease*. Information Report O-X-432. National Resources Canada. Canadian Forest Service. Ontario. Canada.

SCALA, A.; TEGLI, S.; COMPARINI, C.; MITTEMPERGUER, L.; SCALA, F.; DEL SORBO, G. (1993). Influence of fungal inoculum on cerato-ulmin production; purification of cerato-ulmin and detection in elm sucker cuttings. (En prensa).

SCHEFFER, R. J.; LIEM, J.I. y ELGERSMA, D. M. (1987). Production in vitro of phytotoxic compounds by non-aggressive and aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi*, the Dutch Elm Disease Pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 30:321-335.

SMALLEY, E. B.; RAFFA, K. F.; PROCTOR, R. H.; KLEPZIG, K. D. (1993). Tree responses to infection by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. En: *Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*. Editado por: Wingfield, M. J.; Seifert, K. A.; Webber, J. F. 125-132

TAKAY, S. (1980). Relationship of the production of the toxin cerato-ulmin to sennemata formation, pathogenicity, micelial habit and growth of *Ceratocystis ulmi* isolates. *Can. J. Bot.* 58:658-662.

TAKAY, S.; RICHARDS, C. (1978). Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: Isolation and some properties of the cerato-ulmin from the culture of *C. ulmi*. *Phytopath. Z.* 91:129-146.

TEGLI, S; COMPARINI, C; GIANNETTI, C; SCALA, A. (1993). Efect of temperature on growth and cerato-ulmin production of *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. *Mycol. Res.* 97(0):1-5.

Aislamiento	Origen	Fecha de aislamiento
PM-MT1	Manút (Mallorca)	1987
VA-VC1	Viana de Cega (Valladolid)	1991
PM-AB1	Albarca (Mallorca)	1992
PM-PL1	Pollensa (Mallorca)	1992
TO-VL1	Velilla (Toledo)	1993
PM-DF1	Deflá (Mallorca)	1994
SO-AL1	Almazán (Soria)	1994
SO-MD1	Medinaceli (Soria)	1994
SO-PT1	Portel (Soria)	1994

Tabla 1. Aislamientos de *Ophiostoma* utilizados en la presente memoria.

Genotipo de <i>O. ulmi</i>	CS (mm/día)	PF (mg)	PS (mg)	CRA (%)	NE ($\times 10^6$)	IPC (I.P.C.)	Pr.EM ($\mu\text{g/ml}$)	Pr.E ($\mu\text{g/g.p.f.}$)
PM-AB1	2.6	810	155.3	80.8	295.2	112.5	35.3	1008.8
PM-DF1	1.6	730	161.1	77.9	330.7	16.1	26.3	2493.7
PM-MT1	2.8	570	86.2	84.8	199.3	382.5	79.0	1428.2
PM-PL1	2.9	520	58.5	88.7	218.8	4.9	31.9	1337.5
Media	2.47	658	115.3	83.0	261.2	129.00	43.1	1567.1
(S.E.)	0.59	135.49	50.9	4.7	62.2	175.78	24.1	643.5

Genotipo de <i>O. novo-ulmi</i>	CS (mm/día)	PF (mg)	PS (mg)	CRA (%)	NE ($\times 10^6$)	IPC (I.P.C.)	Pr.EM ($\mu\text{g/ml}$)	Pr.E ($\mu\text{g/g.p.f.}$)
SO-AL1	4.6	490	79.4	83.7	259.0	561.2	143.7	816.1
SO-MD1	4.3	630	108.4	82.7	212.4	584.8	161.8	657.4
SO-PT1	4.4	580	108.3	81.3	272.6	517.5	123.4	702.7
TO-VL1	6.3	780	147.9	81.0	265.1	558.0	160.3	884.1
VA-VC1	4.1	700	142.8	79.6	209.9	609.0	153.5	1269.5
Media	4.74	636	117.3	81.7	243.8	566.1	148.58	866.0
(S.E.)	0.89	111.0	28.2	1.6	30.2	34.1	15.76	242.8

Tabla 2. Peso fresco (PF), peso seco (PS), contenido relativo en agua (CRA), número de esporas por ml (NE), índice de producción de ceratoulmina (IPC), proteínas excretadas al medio (Pr.EM) y proteínas estructurales (Pr.E) en los cultivos líquidos de los aislamientos de *Ophiostoma ulmi* y *O. novo-ulmi*.

a) ($C_c = 0.83$; $R^2 = 70$).

b) ($C_c = 0.97$; $R^2 = 99$).

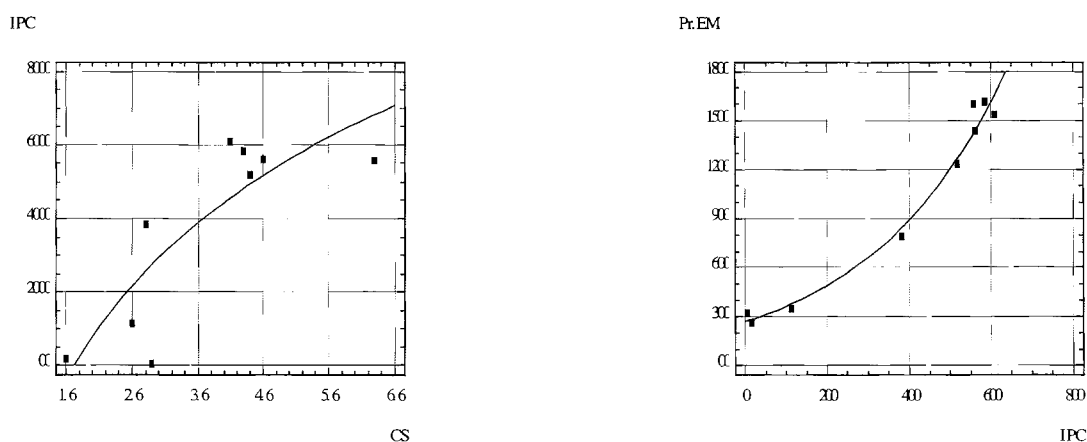


Figura 1. a) Relación existente entre el crecimiento de los aislamientos en medio sólido (CS) y el índice de producción de ceratoulmina (I.P.C.). b) Relación existente entre el I.P.C. y el contenido proteico de los filtrados (mg/ml) en los nueve aislamientos analizados.